Lane Medical Library

Aus dem Städt. Hygienischen Universitäts-Institut zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Neisser)

Ueber die künstliche Erzeugung von Bakteriophagen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Universität Frankfurt a. M.

vorgelegt von

Nikolaus Leitner
aus Groß-Wardein

Jena
Gustav Fischer
1928

Aus dem Städt. Hygienischen Universitäts-Institut zu Frankfurt a. M.
(Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Neisser)

Ueber die künstliche Erzeugung von Bakteriophagen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Universität Frankfurt a. M.

vorgelegt von

Nikolaus Leitner
aus Groß-Wardein

Jena
Gustav Fischer
1928

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Frankfurt a. M.

Dekan: Prof. Dr. V. Schmieden.
Referenten: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Neisser.
Prof. Dr. B. Fischer-Wasels.

Als Preisarbeit der Medizinischen Fakultät für das Jahr 1927
am 18. I. 1928 anerkannt. (Eingereicht am 1. XII. 1927.)

Für den Druck wurde die Arbeit stark gekürzt.

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
Bd. 57. 1928.
Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Inhaltsverzeichnis: Einteilung und Fragestellung S. 2. — I A. Erzeugung des lytischen Prinzips aus den Bakterien mit Hilfe leukozytärer Exsudate S. 3. — I B. Verdauungsapparat und Bakteriophagie S. 7. — II. Gewinnung des lytischen Prinzips aus den Bakterien allein: A. Durch bakteriellen Antagonismus S. 19. — B. Aus alten Kulturen, durch Autolyse usw. S. 23. — Zusammenfassung S. 31. — Literatur S. 34.

d'Herelle nahm bekanntlich an, daß das lytische Prinzip ein filtrierbares, lebendiges Virus sei — ähnlich z. B. dem Pocken- oder Masernvirus —, welches in den Bakterien parasitiere. Die unbegrenzte Uebertragbarkeit erklärte sich somit aus der Vermehrung des Virus, und die bekannten Plages sind isolierte Kolonien desselben. Er benannte sein Prinzip: Bakteriophagum intestinale.

Die Nachuntersucher bestätigten zum größten Teil d'Herelles grundlegende Befunde, aber seine Deutung, die Annahme eines Lebewesens, eines filtrierbaren Virus fand bald Gegner.

Man untersuchte das biologische Verhalten der Bakteriophagen und verglich es mit dem der Bakterien. Man suchte bei dem Bakteriophagen nach Analogien mit den Bakterien, und da man sie nicht immer fand, schloß man die Lebewesennatur der Bakteriophagen aus (z. B. Kabéshima). Die Beweiskraft dieser indirekten Beweise ist sehr umstritten.

Würde es aber gelingen, aus den, nach den bekannten Methoden phagenfrei gefundenen Bakterienstämmen durch irgendwelche Einwirkung Phagen zu erzeugen, so würde dieses experimentum crucis ein endgültiger Beweis gegen die Annahme eines selbständigen Lebewesens sein.

Wir möchten einiges Technisches, was sowohl die Untersuchungen, wie die gebrauchten Termini betrifft, vorausschicken.

Die Arbeit wurde mit Mitteln der Stiftung „Georg Speyer-Haus“ durchgeführt.

Die Kenntnis der allgemein üblichen bakteriophagischen Technik, wie der Grundeigenschaften des lytischen Prinzips wird vorausgesetzt. Bei den Untersuchungen haben wir immer dieselben 4 Stämme verwendet, um Vergleiche zwischen den einzelnen Methoden der Bakteriophagenerzeugung anstellen zu können.

Diese Stämme — NO 24 und Va 213 (Coli), M 10 (Dysenterie Flexner), M 37 (Dysenterie Shiga-Kruse) und K 11 (Typhus) — werden seit Jahren nach einer zweimaligen Reinzüchtung im Hygienischen Institut Frankfurt a. M. mit dreimonatlicher Ueberimpfung weitergezüchtet. Spontane phagische Zeichen wurden an ihnen nie beobachtet (aber s. II. Teil). Alle diese Stämme sind sehr phagenempfindlich und wurden deshalb als Teststämme verwendet. — Was die Termini betrifft, wir werden abwechselnd die Ausdrücke Bakteriophagen, lytisches Prinzip, lytisches Agens usw. gebrauchen, ohne damit gewisse Vorstellungen, die Natur dieses Prinzips betreffend, zu verknüpfen. Die Begriffe Sensibilität, Resistenz und Lysogenität werden wir später in extenso besprechen, hier wollen wir nur bemerken, daß wir zunächst mit dem Ausdruck „lysogen" lediglich die Eigenschaft mancher Stämme bezeichnen, spontan leicht Phagen abzugeben, gegen welche sie zum Teil oder auch ganz resistent sind. — Die zitierten Arbeiten habe ich, soweit sie mir zugänglich waren, im Original gelesen.

Einteilung.

Die Versuche und Mitteilungen, die sich mit der Frage der Erzeugung von Bakteriophagen beschäftigen, lassen sich in 2 große Gruppen teilen:

1) Erzeugung des lytischen Prinzips aus den Bakterien unter der Einwirkung des lebenden Organismus bzw. der Produkte derselben.

2) Erzeugung des lytischen Prinzips aus den Bakterien allein, ohne Einwirkung des lebenden Organismus.

In der ersten Gruppe lassen sich zwanglos zwei Richtungen unterscheiden. Die eine Richtung, an die bekannten immunisatorischen Wirkungen des lebenden Organismus anknüpfend, nimmt eine Entstehung des lytischen Prinzips aus den Bakterien an, unter Einwirkung leukozytärer Exsudate. Bei den Untersuchungen der zweiten Richtung hat die wohl zweifellose Darmgebundenheit der Bakteriophagen den Weg gezeigt.

Wir wollen nun im folgenden auf die einzelnen angegebenen Methoden der Bakteriophagenerzeugung eingehen. Die Versuche haben wir, soweit wir es für notwendig erachteten, nachgemacht, und kritisch besprochen. Bei unseren Versuchen waren wir darauf

bedacht, der heutigen Kenntnis der bakteriophagischen Erscheinungen entsprechende einwandfreie Versuchsbedingungen zu schaffen. So haben wir z. B. im zweiten Teil dieser Arbeit neue Versuchsanordnungen getroffen, um die Rolle des Darmtraktes und seiner Drüsen bei der Bakteriophagenerzeugung untersuchen zu können. — Auf die einzelnen Theorien, die Natur des lytischen Prinzips betreffend, wollen wir nicht eingehen, da sie uns zu weit führen würden. Wir schneiden sie nur dann an, wenn sie für die von den betreffenden Autoren ausgeführten Versuche wegweisend waren.

I A. Erzeugung des lytischen Prinzips aus den Bakterien mit Hilfe leukozytärer Exsudate.

Nach d'Herelles Angabe suchte man und fand die Phagen in Stuhlfiltraten. Von der überaus weiten Verbreitung der Phagen in der Natur (Erde, Wasser [Dumas]) wußte man noch nichts. Lebender Organismus und Phagen waren in den Gedankengängen der Forscher fest verbunden. Kabéshima nahm z. B. an, daß das primum movens ein Katalysator sei, welcher als Abwehrprodukt vom Organismus gebildet würde. Suchte man also die Phagen zu erzeugen, so nahm man als den einen Faktor den lebenden Organismus bzw. die Produkte desselben an.

Bordet und Ciuca suchten den Ursprung der Phagen in den Bakterien selbst. In ihnen soll als Variation ein autolytisches Ferment entstehen, das die Fähigkeit besitzt, die Bakterien aufzulösen. Auch die Nachkommen dieser Bakterien sollen die Fähigkeit besitzen, dieses Ferment zu produzieren. Dasselbe diffundiert aus den Bakterien in die Umgebung, und befindet sich also in dem keimfreien Filtrat. Sie spritzten Meerschweinchen 3—4mal intraperitoneal eine Aufschwemmung von Colibazillen in mehrtägigen Intervallen ein, entnahmen dann Exsudat aus der Peritonealhöhle und untersuchten es auf Phagen. Wie sie in einer späteren zusammenfassenden Arbeit angeben, erhielten sie Phagen in 8 von 12 Fällen. Die Phagen wirkten stark auf intakte Bakterien des eingespritzten Colistammes. Der Kot dieser Tiere enthielt keine Phagen. Sie schrieben dem leukozytären Exsudat, entstanden durch die Einspritzung von Colibazillen, die Fähigkeit zu, die „viciation nutritive héréditaire", die durch fermentative Tätigkeit bewirkte Entartung der Bakterien, hervorzurufen.

Es fehlte nicht an Nachuntersuchern, die aber keine eindeutigen Resultate erhielten.

Wollstein, Bail (mit Shigabazillen) erhielten Phagen, wenn sie einmalig eine größere Bakterienmenge einspritzten. Otto und Munter konnten mit Coli keine Phagen erzeugen, wohl aber, wenn sie Shigabazillen einspritzten. Kuttner hatte genau nach Bordet und Ciucas Angaben 10 Meerschweinchen mit 10 verschiedenen Colistämmen gespritzt und erhielt so nie Phagen; erhielt aber solche, wenn sie einmalig Typhusbazillen spritzte (2 Fälle).

Interessant und beachtenswert sind G. Meißners Resultate. Sie spritzte, auf C. Prausnitz' Anregung, Meerschweinchen intraperitoneal mit Choleravibrionen und erhielt spezifische, nur gegen Cholera wirksame Phagen. Spritzte sie aber sterile Bouillon anstatt Vibrionen, erhielt sie dieselben Phagen. Diese waren also schon intraperitoneal präexistent.

Neben vielen Versagern finden wir also auch positive Ergebnisse.

Die Beurteilung dieser positiven Resultate ist schwierig, da bei den Versuchsbedingungen, nach unserer heutigen Kenntnis der Bakteriophagie, manche Fehlerquellen nicht berücksichtigt wurden.

1) Die Möglichkeit, daß die Bakteriophagen aus dem Darmtrakt in die Peritonealhöhle übertreten können. Dieser Einwand d'Herelles gegen Bordet und Ciucas Versuche wurde durch Sumiyoshi und Zoeller und Manoussakis experimentell bestätigt. — [Der Auffassung d'Herelles, daß die Bakteriophagen regelmäßig aus dem Darm in die Blutbahn übertreten, und somit sich in den Leukozyten vorfinden, können wir nicht zustimmen. Dagegen spricht der Umstand, daß man Bakteriophagen im Blut nicht oder äußerst selten findet (Kuttner in 6 von 50 Fällen), während der Stuhl immer Phagen enthält. Dann die Tatsache, daß experimentell in die Blutbahn reichlich eingebrachte Bakteriophagen in kurzer Zeit verschwinden (Kabéshima)].

2) Daß die verwendeten Stämme lysogen waren (darunter verstehen wir lege artis reingezüchtete Stämme, die zunächst keine phagischen Zeichen aufweisen, die aber gelegentlich Phagen abgeben, gegen welche sie wenigstens zum Teil resistent sind. Da diese Stämme aus dem Darm stammen, wo sie reichlich Gelegenheit hatten, mit Phagen in Berührung zu kommen, und auf Grund ihres ähnlichen Verhaltens wie die in vitro hergestellten künstlichen „Mischkulturen" zwischen Bakterien und Bakteriophagen, werden sie von manchen Autoren [d'Herelle, Beckerich und Hauduroy u. v. a.] als in der Natur vorkommende Mischkulturen angesehen); in diesem Fall entstehen keine neuen Phagen aus den Bakterien, sie werden nur unter der Einwirkung des leukozytären Exsudates manifest. Die Lysogenität des verwendeten Bakterienstammes ist für manche positive Versuchsergebnisse sicher verantwortlich. So teilten z. B. Lisbonne und Carrère mit, daß sie den von Bordet und Ciuca bei ihren Versuchen verwendeten Colistamm für lysogen erkannten.

3) Die Adaptation. Um ein Untersuchungsobjekt phagenfrei zu erklären, genügt die übliche Untersuchung auf Phagen nicht, da sie die Möglichkeit der Adaptation schon vorhandener Phagen, und die Anreicherung schwacher Phagen nicht berücksichtigt. Um diese Möglichkeit auszuschließen, haben wir bei unseren Versuchen 3 Passagen angewendet.

(Aus ähnlichen Erwägungen müssen wir den Versuchen A. Kuttners „Erzeugung von Bakteriophagen mit Organextrakten" die Beweiskraft absprechen.)

Eigene Versuche.

Wir haben Bordet und Ciucas Versuche mit 3 Meerschweinchen nachgemacht. Die Fäzes der Tiere wurden auf Phagen untersucht mit der oben angegebenen Methode. Geprüft wurden die Filtrate gegen Va213, M10 und M37. Im Kot des einen Meerschweinchens fanden wir, aber erst nach der zweiten Passage, gegen Va213 schwach wirksame Phagen. Die anderen Tiere enthielten gegen unsere Stämme keine Phagen.

Die Tiere wurden in 2—3tägigen Intervallen gespritzt mit Va213, in steigenden Mengen (½, ¾, 1,0, 1¼ Oese Schrägagarkultur) in je 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Bei der 4. Einspritzung erhielten sie noch je 5 ccm eines Bouillon- + physiologischer Kochsalzlösunggemisches. 5 Stunden danach wurde steril, mittels Spritze, Exsudat entnommen. Aus dem Exsudat haben wir a) den Stamm wieder herausgezüchtet, er zeigte keine phagischen Zeichen. Das Exsudat enthielt nur Colibazillen; b) je einen Tropfen auf Agarplatten ausgestrichen und homolog, d. i. mit einer Oese Va213 beimpft. Die Platten zeigten nach 13 Stunden einen normalen Rasen; c) den Rest des Exsudates mit je 10 ccm Bouillon versetzt, mit Va213 Bouillonkultur reichlich beimpft, und 24 Stunden bebrütet, dann filtriert und das Filtrat auf Phagenwirkung geprüft bzw. für Passagen verwendet. Bei allen diesen Versuchen fanden wir keine Phagen. Wir spritzten wieder zweimal Colibazillen, entnahmen dann Exsudat und untersuchten sie wie oben beschrieben; wieder mit negativem Erfolg. Die Tiere gingen 1—2 Tage nach der 6. Einspritzung ein.

Wir konnten also in unseren Versuchen nach der Methode Bordet und Ciuca keine Phagen gewinnen.

Erzeugung des lytischen Prinzips mit Hilfe leukozytärer Exsudate in vitro.

d'Herelle erklärte Bordet und Ciucas positive Resultate mit einer Phagen-Auswanderung durch die intakte Darmwand; die so erhaltenen Phagen sind nicht erzeugt, nicht durch die fermentative Wirkung des leukozytären Exsudats entstanden, sie sind Darmphagen, das in den Bakterien parasitierende Virus. Das Bestreben der Forscher auf diesem Gebiet war nun, um diesem Einwand zu entgehen, den Darm, Bauchhöhle bei ihren Versuchen ganz auszuschalten.

Lisbonne, Boulet und Carrère erzeugten sterile Abszesse beim Hund durch subkutane Einspritzung von Terpentinöl. Das entnommene Exsudat ließen sie dann auf eine Shigaemulsion in Bouillon einwirken und erhielten nach 3—4 Passagen gegen Shigabazillen wirksame Phagen. Den ersten Anstoß, das primum movens schreiben sie den in den Leukozyten vorhandenen Fermenten zu. Auch Pico erhielt Shigaphagen mit Hilfe steriler Exsudate. Marcuse konnte diese Befunde nicht bestätigen.

Auch mit „Hilfe" anderer Fermente, tierischer und pflanzlicher Herkunft wurden Phagen erzeugt, so mit Papain, Papaiotin (Pico), mit Mellins Food (Lisbonne, Boulet und Carrère), dem Gift des Lachasis alternatus (Bachmann und Aquino) und schließlich mit Pankreasfermenten.

Die Einwände gegen positive Ergebnisse der Phagenerzeugung mit Hilfe leukozytärer Exsudate in vitro — Darmdurchwanderung, Verwendung lysogener Stämme — wurden oben besprochen.

Eigene Versuche.

Bei einem unserer Versuchshunde trat ein Bauchdeckenabzeß auf. Der entnommene Eiter enthielt eine Reinkultur von grampositiven, anaëroben Diplokokken. Wir verwendeten den Eiter, um nach den Angaben von Lisbonne, Boulet und Carrère Phagen zu gewinnen. Wir befolgten genau ihre Vorschriften.

30 Tropfen des Eiters 10 ccm Bouillon zugesetzt und reichlich mit einer jungen Bouillonkultur von Shigabazillen beimpft, 2 Tage bei 37° bebrütet, dann filtriert. Je 0,5 ccm des Filtrates mit Fürthplatten gegen Coli (NO 24), Flexner (M 10) und Shigabazillen (M 37) auf Phagenwirkung geprüft. Ergebnis: 0. Der Rest des Filtrates wurde mit Bouillon versetzt, beimpft, nach 2tägigem Brutschrankaufenthalt filtriert usw., also Passagen gemacht. Wir führten es bis zur 6. Passage und haben nach jeder derselben, wie oben beschrieben, auf Phagen geprüft.

Wir erhielten keine Phagen. — Der Hund hatte im Kot stark wirksame Phagen gegen vorher genannte Stämme.

Es gelang uns also nicht — trotzdem im Kote des Tieres Phagen vorhanden waren — durch Einwirkenlassen eines leukozytären Exsudates auf Shigabazillen in vitro, Phagen zu erzeugen.

I B. Verdauungsapparat und Bakteriophagie.

d'Herelle gab als Fundort der Bakteriophagen die Fäzes an. Im Darminhalt seien die Phagen als Parasiten der Darmbakterien vorhanden und würden mit den Exkrementen ständig ausgeschieden. Auch in den Gedankengängen Kabéshimas waren Bakteriophagen und Verdauungsapparat fest miteinander verbunden.

Die Annahme des Darmgebundenseins des lytischen Prinzips gab den Versuchen von einer Reihe von Autoren die Richtung. Man begann die Teile des Verdauungsapparates, die Drüsen und ihre Sekretionsprodukte auf ihre Fähigkeit zu prüfen, durch Einwirkung auf Laboratoriumsstämme in vitro, die fortzüchtbare Lyse hervorzurufen.

Pico war der erste, der berichtete, daß ihm die künstliche Erzeugung von Bakteriophagen mit käuflichen Pankreaspräparaten gelungen sei. Diese wichtigen Befunde Picos fanden bald Anklang, weil seine Ergebnisse in die gleiche Richtung wiesen, wie diejenigen von Bordet und Ciuca (intraperitoneale, leukozytäre Exsudate), Lisbonne, Boulet und Carrère (Leukozyten in vitro).

v. Noorden sprach die Meinung aus, daß die Keimarmut bzw. Bakterizidie des oberen Dünndarmabschnittes mit dem Bakteriophagen zusammenhängt (zit. n. Magnus-Alsleben). Für die Richtigkeit dieser Annahme sprechen die Befunde Borchardts, der, die einzelnen Darmabschnitte isoliert auf Phagen untersuchend, fand, daß diese in größter Konzentration und Wirkungsbreite im Duodenum anzutreffen sind und daß sie analwärts allmählich an Stärke und Menge abnehmen. Diese Befunde sind — nach O. Kestner — eine gute Erklärung für die Keimarmut des Dünndarms. Doerr, C. Prausnitz und van der Reis, A. Dimtza treten dieser Meinung entgegen.

Eine Reihe von Autoren prüften Picos Befunde nach. Bachmann und Aquino, Combiesco, Jötten, W. Keller, Hoder und Suzuki, Wolff bestätigten, daß sie mit käuflichen Pankreaspräparaten die Lyse hervorrufen konnten, während Borchardt, Flu, Seiffert, Bürgers und Bachmann, E. Klieneberger, Picos Befunde nicht bestätigten. In der Deutung ihrer Befunde waren die oben genannten Autoren verschiedener Meinung. Jötten schloß sich Pico an, Bachmann und Aquino erklärten ihre Befunde damit, daß ihre Stämme lysogen seien, während Combiesco der Meinung ist, daß die Phagen in den Pankreaspräparaten schon fertig vorhanden seien, sie kämen während der Präparation durch Verunreinigung mit Darminhalt hinein. Diese

Annahme Combiescos erklärt die einander widersprechenden Befunde verschiedener Autoren. Es kommt eben darauf an, ob das Pankreas mit dem phagischen Darminhalt in Berührung kam oder nicht.

Borchardt ging bei seinen Untersuchungen zum Tierversuch über. Sein Ziel war, die Beziehungen der Bakteriophagen zum Darmtrakt festzustellen.

Borchardt untersuchte an 2 aufeinanderfolgenden Tagen den Kot eines Kaninchen auf gegen Y-Bazillen wirksame Phagen. Am 3. Tage bekam das Tier 1 ccm einer normalen Sodalösung zur Abstumpfung der Magensalzsäure, dann wurde mit der Sonde die Bouillonaufschwemmung zweier Dysenterie-Y-Stämme Schrägagarkulturen verfüttert. Der Kot wurde täglich untersucht. Er fand, daß, während vor der Fütterung der Kot keine Phagen gegen Y zeigte, schon 24 Stunden danach schwache Y-Phagen auftraten, die nach 2 Tagen an Stärke zunahmen. 5 Tage nach der Fütterung enthielt der Kot wieder keine Y-Phagen. Das Tier zeigte keine Krankheitserscheinungen. Die Phagen- und Bakterienzahlen standen in umgekehrtem Verhältnis zueinander. Borchardt erklärte sich diese Ergebnisse mit einer Erzeugung von Bakteriophagen zur Abwehr gegen die Bakterien. Dieser Versuch war für seinen weiteren Weg bestimmend.

Borchardt gibt nicht an, ob er die Kotfiltrate gegen andere Bakterienarten untersucht hat. Hatte das Tier Phagen gegen Coli- oder andere Stämme, so ist es leicht möglich, daß im Darmkanal nicht eine „Erzeugung" von Phagen, sondern nur eine Adaptation der schon vorhandenen Phagen an den eingeführten Stamm stattfand. Eine solche Adaptation haben wir in vitro öfters, manchmal schon nach kurzer Zeit beobachtet.

Sumiyoshi hat gleiche Versuche mit Shigabazillen gemacht, mit negativem Erfolg. Die Magensalzsäure hat er aber nicht abgestumpft.

Borchardt ging nun dazu über, die einzelnen Teile des Magen-Darmtraktes auf ihre Wirkung zu untersuchen. Während er mit Speichel und Magensaft keine Phagen erhielt, bekam er mit Duodenalsaft und mit dem der tieferen Dünndarmabschnitte gegen eine Reihe von Bakterienarten Phagen. Da das lytische Prinzip in den tieferen Dünndarmabschnitten sich allmählich abschwächt, nahm er an, daß das die Bakteriolyse in Gang setzende Etwas, das „primum movens" im Duodenalsaft zu suchen sei. Er ging nun zur näheren Untersuchung der Frage über: welchem Anteil des Duodenalinhaltes ist diese Fähigkeit zuzuschreiben?

Er ging dann auf Grund theoretischer Erwägungen zur experimentellen Beantwortung der Frage über: ist das aktivierte Trypsin das die fortzüchtbare Lyse erstmalig hervorrufende Prinzip?

Einer nach 24 Stunden Hungerns getöteten Katze wurden Pankreas und Dünndarm entnommen, der Darm gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, die Schleimhaut abgekratzt, im Mörser zerstampft und mit Kochsalzlösung versetzt. Das Pankreas wurde ebenfalls zerstückelt, mit Sand verrieben und Kochsalzlösung zugesetzt. Die so gewonnenen Extrakte wurden, jeder für sich und gemischt, stark beimpften Bouillonkulturen zugesetzt, 24 Stunden bei 37° bebrütet, dann filtriert und gegen homologe Stämme geprüft. Er fand nun, daß, während die Extrakte für sich phagisch unwirksam waren, und zwar auch nach zwei Passagen (½ ccm Filtrat auf 8 ccm Bouillon), das Gemisch

derselben eine bakteriophagische Wirkung hervorrief; und zwar stark gegen Flexner und Coli, schwächer gegen Paratyphus B und Typhus. Er schloß daraus, daß das durch die Enterokinase des Darmes aktivierte Trypsinogen des Pankreas die lytische Wirkung des Darms hervorrufe. Bei seinen anderen Versuchen erhielt er nicht so eindeutige Resultate, manchmal bekam er mit Pankreas allein, manchmal mit dem Dünndarmextrakt allein Phagen. Die positiven Befunde mit Pankreas allein erklärt er damit, daß im Pankreas schon aktiviertes Trypsin vorhanden war.

Borchardts Deutung, daß das durch Enterokinase aktivierte Trypsin das primum movens des lytischen Prozesses sei, erregte das größte Interesse der Forscher.

Es fanden sich bald Nachuntersucher. Flu, W. Keller konnten Borchardts Befunde nicht bestätigen, Bürgers und Bachmann bestätigen sie. Keller teilt ausführlich seine Versuche mit, wir wollen kurz auf sie eingehen. Er machte Borchardts Versuche genau nach, mit dem Unterschied, daß er das Pankreas beim Tier möglichst steril entnahm. Mit den so entnommenen Bauchspeicheldrüsen allein erhielt er keine Phagen. Borchardts und Hoder und Suzukis Befunde — sie erhielten manchmal auch aus Pankreas allein Phagen — erklären sich, wie E. Klienebergers zahlreiche Untersuchungen zeigen, mit der Verunreinigung der Organe mit aus dem Darminhalt stammenden Phagen bei unsteriler Entnahme derselben. Sie entfernte unter sterilen Bedingungen verschiedene Organe — Pankreas, Thymus usw. — von Schlachttieren und untersuchte sie auf Phagen, immer mit negativem Erfolg; während die unsteril entnommenen immer Phagen enthielten. Abstriche von den Messern und Tischen des Schlachthofes, das Spülwasser, die Hände der Metzger lieferten stark wirksame Phagen: eine Erklärung obiger Versuchsergebnisse.

Keller fand nun, daß Pankreas allein keine Phagen gibt, und daß die mit dem Gemisch Pankreasextrakt und Dünndarmschleimhaut erhaltenen Phagen schon im Dünndarmextrakt allein vorhanden waren.

Keller führt auch einen anderen Versuch an, der ihm beweisend gegen Borchardts Theorie zu sein scheint. Er entnahm öfters einem Duodenalfistelhund Duodenalsaft und wertete ihn quantitativ in bezug auf die tryptische Wirkung und bakteriophagische Fähigkeit aus. Er fand, daß der Trypsingehalt und der Lysatgehalt nicht parallel gehen und schloß daraus, daß „eine ursächliche Beziehung beider Körper zu einander nicht möglich erscheint". Auch diese Beweisführung halten wir nicht schlagend; denn, angenommen, daß die Phagen unter der Einwirkung des aktivierten Trypsins entstehen würden, so sind doch die einmal entstandenen Phagen vermehrungsfähig, folglich ist die Phagenmenge nicht nur vom Trypsin, sondern in erster Reihe auch von der Menge und Empfindlichkeit der an Ort und Stelle befindlichen Bakterien abhängig. Trypsingehalt und Phagengehalt müssen also nicht parallel gehen.

Bürgers und Bachmann haben Borchardts Versuche bestätigt. Sie haben aus mit Pankreas und Darmschleimhaut versetzten Kulturen Phagen gewonnen, sie geben aber nicht an, ob die Darmschleimhaut allein schon phagenhaltig war oder nicht.

Da uns die Ergebnisse Borchardts aus den vorher schon angedeuteten Gründen für besonders wichtig erschienen, nahmen wir eine Wiederholung seiner Versuche vor. Unsere Fragestellung war: Welche Rolle spielen die Enterokinase und das Trypsinogen für sich und ein Gemisch derselben bei dem Ingangsetzen der fortzüchtbaren Lyse? (Wir wollen in unseren weiteren Besprechungen der Einfachheit und leichteren Verständlichkeit halber die allgemein gebräuchliche Bezeichnung Trypsinogen für die Zymogenstufe, für die noch nicht „aktivierte" Vorstufe des Trypsins verwenden und für die Verbindung der Enterokinase mit dem Trypsin das Wort „Aktivieren" — trotzdem die Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz die Fragen in ein anderes Licht setzten). Borchardts Versuchsanordnung und Ergebnisse hielten wir für die Entscheidung dieser Frage aus folgenden Gründen für nicht einwandfrei und beweisend.

1) Er hat aus einem einzigen eindeutig ausfallenden Versuch seine sehr weitgehenden Schlüsse gezogen.

2) Wir glauben, daß seine anderen positiven Befunde eine andere Ursache hatten, nämlich, daß Borchardt bei der Entnahme und Verarbeitung der Organe nicht steril arbeitete und so zu einer Verschmutzung mit Darminhalt oder anderen phagenhaltigen Materialien kam. E. Klienebergers Versuche zeigen, daß steril entnommenes Pankreas allein nie, unsteril entnommenes meist Phagen abgaben.

3) Dem anderen Einwand, daß in seinem Versuche der Schleimhautextrakt allein schon Phagen hatte, suchte Borchardt so zu entgehen, daß er, um die eventuell vorhandenen Phagen anzureichern, eine Passage machte; d. h. daß er die beimpften Bouillonkulturen, die mit Pankreas- bzw. Schleimhautextrakt versetzt waren, durch die Kerze filtriert und je ½ ccm der Filtrate frisch beimpften Bouillonkulturen zusetzte. Das Darmfiltrat lieferte wieder keine Phagen, ebenso das Pankreas allein nicht, während beide zusammen wieder Phagen ergaben. — Auf Grund dieser Ergebnisse schließt Borchardt die Möglichkeit aus, daß die Phagen schon im Darmextrakt vorhanden waren. Wir halten diese einmalige Passage für nicht genügend, weil wir, gleich vielen anderen Autoren, die Beobachtung machten, daß schwache Phagen und besonders, wenn sie in geringer Anzahl vorhanden sind, erst eine Anreicherung durch 2—3 Passagen benötigen, um manifest zu

werden. Außerdem hat Borchardt nur ½ ccm des Filtrates zu 8 ccm neu beimpfter Bouillon zugesetzt, bei größerer Filtratmenge wären vielleicht die Resultate anders ausgefallen.

Schließlich läßt die Kenntnis der phagenverstärkenden Wirkung von Organextrakten, die E. Klieneberger im hiesigen Institut nachgewiesen hat (die Arbeit erschien im Bd. 56 dieser Zeitschrift), das Versuchsergebnis Borchardts in anderem Licht erscheinen. Es ist die Annahme berechtigt, daß bei seinem Versuch im Duodenalextrakt ein schwacher Phage in geringer Menge vorhanden war, der durch die verstärkende Wirkung des Pankreasextraktes manifest wurde.

Unser Ziel war einwandfreiere Versuchsbedingungen zu schaffen.

Die größte Schwierigkeit bereitet dabei die Gewinnung der Enterokinase, da sie aus dem Dünndarm gewonnen werden muß, den wir immer für verdächtig auf Phagengehalt ansprechen müssen, auch wenn sie zunächst gegen unsere Stämme nicht wirken (Adaptationsmöglichkeit).

Würde es uns aber gelingen, eine von uns bereitete Enterokinase-Lösung, die zunächst sich gegen einige Stämme als phagisch wirksam erweist, durch irgendeinen Vorgang gegen dieselben Stämme phagisch unwirksam zu machen, aber so, daß dabei die aktivierende Wirkung auf Trypsinogen erhalten bleibt, so würden wir diese Enterokinase-Lösung für phagenfrei erklären dürfen.

Mit verdünnter Säure angesetzte Versuche führten uns nicht zum Ziel. Wir versuchten es nun, mit neutralen Chininsalzen, deren elektive phagentötende Wirkung aus Eliava und Pozerskis Versuchen bekannt ist.

Wir versetzten gleiche Mengen eines gegen unseren Stamm NO 24 stark wirksamen Colilysates mit fallenden Mengen einer 10proz. Chininlösung, so daß unsere Phagenaufschwemmungen sich in 0,5; 1,0; 1,5 bzw. 2,0proz. Lösung von Chinin. hydrochl. befanden.

Nach 24stündiger Einwirkung bei 37° wurde je ein Tropfen dieser Lösungen auf Agarplatten ausgestrichen und mit je einer Oese einer frischen Bouillonkultur von NO 24 beimpft bzw. je ein Tropfen in Bouillon gebracht und ebenso beimpft. Das Protokoll S. 12 zeigt unsere Ergebnisse.

Bei der Einwirkung von Chinin in 1,5proz. Lösungen und darüber während 24 Stunden zeigt sich der Phage auf festem und flüssigem Nährboden unwirksam. Um uns zu vergewissern, daß es sich dabei um eine sichere Abtötung und nicht

No.	Chiningehalt in Proz.	Agarplatte Aussehen nach 18 Std.	In Bouillon Aussehen nach 18 Std.
1	—	++++ R.K.	●
2	0,5	++++ R.K.	●
3	1,0	++/+++	●
4	1,5	—	■
5	2,0	—	■

Zeichenerklärung:

auf festen Nährböden:
- \+ = 1—50 Löcher;
- ++ = mehr als 50 Löcher;
- +++ = konfluierende Löcher;
- ++++ = sterile Platte;
- ++++ R.K. = bis auf einzelne resistente Keime sterile Platte;
- — — — = normaler Rasen.

in flüssigen Nährböden:
- ● = klare Bouillon
- ▲ = schwach getrübt
- ■ = stark getrübt.

nur um eine Abschwächung — von manchen Autoren Inaktivierung bezeichnet — handelt, die oft als Zwischenstufe bei Abtötungsversuchen eingeschaltet ist, haben wir Passagen gemacht; d. h. die Platten 4 und 5 mit Bouillon abgeschwemmt, filtriert und die Filtrate (0,5 ccm für jede Fürthplatte) wieder durch Beimpfung mit dem homologen Stamm geprüft. Wir haben in dieser Art 3 Passagen gemacht, ohne Phagen zu erhalten.

Platte No.	1. Passage	2. Passage	3. Passage
4	———	———	———
5	———	———	———

Wir konnten also annehmen, daß die Phagen abgetötet wurden. Wie verhalten sich nun aber die Fermente in unseren Darmaufschwemmungen gegen solche Konzentrationen von neutralen Chininsalzen?

Enterokinase haben wir nach der folgenden Methode bereitet (angegeben bei E. Zunz in Abderhaldens Biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. III, 1):

Das obere Dünndarmstück eines frisch getöteten Kalbes vom Schlachthof wird gründlich mit Wasser gespült; die Schleimhaut wird abgeschabt und in einer 1½promilligen Natriumkarbonatlösung einige Zeit mazeriert. Diese Mazeration wird dann durch Papier filtriert und das Filtrat mit verdünnter Essigsäure, unter Vermeidung eines Ueberschusses, vorsichtig ausgefällt. Die Fällung enthält die Nukleoalbumine, einen großen Teil der Kinase sowie das

Erepsin. Um die Enterokinase ohne Erepsinzusatz zu gewinnen, haben wir den Niederschlag mit angesäuertem Wasser gut durchgewaschen und diese Flüssigkeit öfters durch Papier filtriert, so daß wir eine klare Flüssigkeit erhielten, welche, wie unsere Versuche zeigen, reichlich Enterokinase enthält.

Ein Teil der abgeschabten Schleimhaut wurde mit Bouillon versetzt, reichlich mit Va 213 beimpft, über Nacht bei 37° bebrütet, dann durch Papier und Kerze filtriert und das Filtrat im Plattenversuch gegen unsere Stämme geprüft.

Geprüft gegen:	Va 213:	M 10:	M 37:	K 11:
Aussehen nach 18 Std.	++/+++	+++	+	—

Die abgeschabte Darmschleimhaut und folglich auch die daraus bereitete Enterokinase enthält Phagen. Wir haben jetzt durch Zusatz von Chinin (1½proz.) die Phagen abgetötet. Wie verhält sich die Enterokinase, wurde sie auch vernichtet?

Wir prüften die Enterokinase auf ihre Fähigkeit, die sogenannte zymogene Vorstufe des Trypsins zu aktivieren. Bevor wir auf diese Versuche eingehen, müssen wir erst einiges über die Gewinnung unseres „Trypsinogens“ sagen.

Entsprechend unserem Vorsatz, möglichst einwandfreies Material und unter physiologischen Bedingungen zu gewinnen, haben wir es uns zur Aufgabe gemacht, bei unseren Versuchen einen von der Bauchspeicheldrüse sezernierten reinen Saft und keinen Extrakt der Drüse zu verwenden.

Unsere Methode bestand darin, bei einem Hund in der Narkose in den isolierten Hauptausführungsgang der Bauchspeicheldrüse eine Kanüle einzuführen, dann mittels Einspritzung von Sekretin eine lebhafte Absonderung von Pankreassaft herbeizuführen, und diesen Saft mit der Kanüle steril aufzufangen.

Sekretin bereiteten wir nach dem Verfahren von Bayliss und Starling.

Ein ca. 1 m langes oberes Dünndarmstück eines frisch geschlachteten Kalbes wird mit Wasser durchgespült; die Schleimhaut wird abgeschabt, mit reinem Sand und etwas 0,4proz. Salzsäure versetzt und in einem Mörser tüchtig zerrieben. Dann setzt man soviel 0,4proz. Salzsäure dazu, bis ein rahmartiger Brei entsteht und läßt diesen ¼—½ Stunde stehen. Nun kocht man bei offener Flamme bis zum Sieden und fügt tropfenweise 10proz. Natronlauge zu, bis die Flüssigkeit, mit Lackmuspapier geprüft, nur noch eine schwach saure Reaktion aufweist. Dieses Stadium erkennt man auch daran, daß die bisher trübe, schaumige, milchige Flüssigkeit eine klare obere Schicht aufweist, während die ausgefällten Nukleoalbumine mit dem Sand am Boden der Porzellanschale liegen. Beim Zusetzen von Alkali muß man sehr vorsichtig sein, ein Ueberneutralisieren, eine alkalische Reaktion ist dabei zu vermeiden, da das Sekretin bei alkalischer

Reaktion leicht zerstört wird. Das erhaltene Gemisch wird schließlich durch Papier filtriert; die Flüssigkeit läuft sehr rasch durch das Filter. — Wir haben immer frisch bereitetes Sekretin verwendet.

Verlauf der Operation[1]). Ein Hund erhält nach 24stündigen Hungerns ca. 0,01 g Morphin pro kg Körpergewicht, dann wird mit Aether narkotisiert und während der ganzen Operation in einer leichten Narkose gehalten. — Eine größere Fußvene wird freigelegt, peripher unterbunden und in den zentralen Teil wird eine Kanüle eingebunden, durch die das Sekretin dem Tier zufließen soll. Das Sekretin befindet sich in einer Bürette, deren untere Oeffnung so reguliert wird, daß dem Tier ca. 1 ccm der Sekretinlösung pro Minute zulaufen soll. Diese Art der kontinuierlichen Sekretinzuführung hat manche Vorteile: Man erzielt eine kontinuierliche Absonderung und der abgesonderte Saft ist proteolytisch unwirksam. Spritzt man dagegen das Sekretin stoßweise in Mengen von 2—3 ccm, so sind die ersten Portionen nach der Einspritzung mehr oder weniger aktiv; diese Portionen sind aber für unsere Zwecke unbrauchbar, da wir den an sich proteolytisch noch unwirksamen Pankreassaft mit der Enterokinase des Darmes aktivieren wollen.

Zur Gewinnung des Trypsinogens wird nun der Bauch des Tieres in der Medianlinie eröffnet; man zieht das Duodeum mit dem Pankreas hervor, und sucht den zweiten Ausführungsgang der Drüse auf. Dieser mündet allein, mit schrägem Verlauf ins Duodenum, 2—3 cm oberhalb der Stelle, wo der Schwanz des Pankreas sich vom Duodenum entfernt. Dieser Gang ist meist in Drüsensubstanz eingebettet und oft nicht leicht zu finden. Er teilt sich bald in der Drüse in 2 Aeste. Ist der Ausführungsgang bis zur Teilungsstelle lang genug, so kann man ihn duodenalwärts, dicht am Darm unterbinden, dann den peripheren Teil von der einen Seite anschneiden, eine Kanüle einführen und mit einem Faden den Gang um die Kanüle befestigen. Die Kanüle muß sehr eng sein, mit einem Durchmesser von ½—¾ mm, mit gut abgeschliffener Oeffnung, damit eine Verletzung der Wand des Ganges vermieden wird; sie kann aus Glas oder Metall sein. — Ist der ungeteilte Teil des Ganges sehr kurz, wie meist der Fall ist, so empfehlen wir

1) Sämtliche Operationen wurden von Herrn Professor Dr. A. W. Fischer, Oberarzt der Chirurgischen Klinik, ausgeführt. Für sein stets hilfreiches Entgegenkommen und Interesse sei an dieser Stelle unser wärmster Dank ausgesprochen.

folgenden Vorgang: Der Darm wird ober- und unterhalb der Einmündungsstelle des Ganges abgeklemmt und auf der, der Einmündungsstelle entgegengesetzten Seite eröffnet. Das meist leere Darmstück wird reingespült, mit Gaze ausgetupft, dann mit Jod bestrichen. Man läßt nun Sekretin zulaufen. Kurze Zeit darauf sieht man an einer Stelle der Wand einen klaren Tropfen herausickern; jetzt beginnt die Sekretion. Man kann nun an dieser Stelle vorsichtig die Kanüle 1—1½ cm tief einführen und dann den Gang um die Kanüle befestigen. Die Gefahr, daß man bei dieser Art des Einführens der Kanüle Keime oder schon fertiges lytisches Prinzip mitschleppt, ist gering, weil beständige starke Sekretion die Keime ausspült. Die erste Portion des Saftes wird außerdem, da proteolytisch meist wirksam, von uns nicht verwendet. Es gelang uns tatsächlich auf diese Art sterilen Pankreassaft zu gewinnen.

Jetzt, wo die Sekretion im Gange ist, und das Sekret mittels Kanüle nach außen geleitet wird, kann man die Bauchwand des Tieres zunähen, und so während der mehrstündigen Narkose, unter stetem Zufluß von Sekretin Pankreassaft gewinnen. Sind nur geringere Mengen des Pankreassaftes notwendig, so kann man die Bauchhöhle offen lassen und die Organe des Tieres durch warme, nasse Tücher vor Abkühlung schützen. Es empfiehlt sich, den mit dem Ductus choledochus gemeinsam mündenden Gang der Bauchspeicheldrüse zu unterbinden.

Wir haben den sezernierten Saft in 3 getrennte Portionen aufgefangen. Die Prüfung auf proteolytische Wirksamkeit erfolgte nach der O. Grossschen Kaseinmethode (beschrieben in Bergmann-Stähelin: Handbuch der inneren Medizin).

1 g caseinum purissimum (Grübler) wird in einem Liter einer 1promilligen Natriumkarbonatlösung aufgelöst und zur Vermeidung der Bakterieneinwirkung mit Chloroform gut durchgeschüttelt. Von dieser Lösung werden zum Gebrauch je 10 ccm in Reagenzgläser gefüllt und steigende Mengen der zu prüfenden Flüssigkeit zugegeben. Man setzt die Röhrchen für einige Zeit in den Brutschrank und versetzt sie dann mit ein paar Tropfen einer verdünnten Essigsäurelösung. Das unverdaute Kasein, z. B. in Kontrollröhrchen, wird ausgefällt und verursacht eine flockige Trübung, während die Röhrchen, in denen das Kasein verdaut wurde, klar bleiben.

Wir haben 0,1 bzw. 0,01 ccm Pankreassaft von jeder der 3 Portionen, die wir, wie angegeben, erhalten haben, zu je 10 ccm Kaseinlösung zugesetzt, ½ Stunde bei 37° bebrütet, dann mit 8 Tropfen verdünnter Essigsäure versetzt. (Es empfiehlt sich, an Kontrollröhrchen erst die geeignete Tropfenzahl zu bestimmen,

da Essigsäure im Ueberschuß zugesetzt das schon gefällte Kasein zum Teil wieder löst und so eine schwache tryptische Wirkung vortäuscht.) Ueber ihre Wirksamkeit gibt folgendes Protokoll Aufschluß.

	Zugesetzte Saftmenge in Proz.	Aussehen der Röhrchen nach Essigsäurezusatz
I. Portion	1,0	●
	0,1	●
II. Portion	1,0	■
	0,1	■
III. Portion	1,0	▲
	0,1	▲
Kontrolle	—	■

● = klar; ▲ = schwach getrübt; ■ = stark getrübt, flockige Ausfällung.

Die erste Portion, die am Anfang sezerniert wurde, war spontan aktiv, die dritte zeigte eine geringe Aktivität, die zweite war inaktiv. Letztere war also für unsere Zwecke brauchbar. Wir versetzten nun gleiche Mengen inaktiven Pankreassaftes mit gleichen Mengen der von uns bereiteten Enterokinaselösung, und zwar: a) mit der nicht vorbehandelten Enterokinase; b) mit der mit Chinin vorbehandelten Enterokinase. Nachdem diese Gemische einige Zeit bei Zimmertemperatur gestanden hatten, prüften wir sie auf ihre Aktivität, wie vorher beschrieben. Wir stießen dabei erst auf Schwierigkeiten, da 0,1 ccm des mit Chinin vorbehandelten Gemisches in der Kaseinlösung sofort eine Ausfällung hervorrief, was der eiweißfällenden Wirkung des Chinins zuzuschreiben ist. Wir prüften nun die tryptische Wirkung mit der sogenannten Jochmann-Platte. Verschiedene Verdünnungen, mit und ohne Chininvorbehandlung aktivierte Gemische wurden auf die Oberfläche von Löfflerserumplatten getropft und mit den nötigen Kontrollen 18 Stunden bei 37° bebrütet. Die Platten zeigten an den Stellen der Tröpfchen starke Eindellungen und Verflüssigung des Serums. Es zeigte sich, daß die von uns bereitete Enterokinase wirksam war und daß diese Wirksamkeit durch die Vorbehandlung mit Chinin nicht beeinträchtigt war. Um nun auch mit der Grossschen Kaseinmethode den Nachweis der Wirksamkeit unserer mit Enterokinase aktivierten Gemische zu erbringen, arbeiteten wir mit stärkeren Verdünnungen. Wir setzten zu den Röhrchen mit Kaseinlösungen ganz geringe Mengen unserer Gemische zu und be-

brüteten sie über Nacht. Bei diesem Zusatz zeigte sich nur eine Spur Ausfällung. Beim Zusatz von Essigsäure am folgenden Tag zeigte sich, daß das Kasein in den Röhrchen verdaut war, nur das Kontrollröhrchen mit dem inaktiven Pankreassaft (1 : 1000) wies die erwartete Fällung auf.

Jetzt waren wir in der Lage, an die Beantwortung der Frage zu gehen, welche Rolle dem aktivierten Trypsin in der Auslösung des lytischen Prinzips in vitro zukommt.

Je 10 ccm Bouillon wurden 1proz. mit inaktivem Pankreassaft, mit der mit Chinin vorbehandelten Enterokinaselösung bzw. mit dem aktivierten Trypsin versetzt, reichlich mit einer jungen Bouillonkultur von Va 213, M 10, M 37 bzw. K 11 beimpft, über Nacht im Brutschrank gehalten, dann durch die Kerze filtriert. Die Filtrate (0,5 ccm in jeder Fürthplatte) mit homologen und heterologen Stämmen auf ihre Wirksamkeit geprüft und der Rest der Filtrate (ca. 1 : 5) mit Bouillon versetzt und neu beimpft. 3 Passagen. Zur besseren Uebersicht fügen wir unser Protokoll bei.

No.	Röhrchen versetzt mit	Beimpft mit	Filtrate geprüft gegen							
			1. Passage				2. Passage			
			Va 213	M 10	M 37	K 11	Va 213	M 10	M 37	K 11
1	E-Kinase	Va 213	—	—	—	—	—	—	—	—
2	Inakt. Pa.-Saft	„	—	—	—	—	—	—	—	—
3	Akt. Trypsin	„	—	—	—	—	—	—	—	—
4	„ „	M 10	—	—	—	—	—	—	—	—
5	„ „	M 37	—	—	—	—	—	—	—	—
6	„ „	K 11	—	—	—	—	—	—	—	—

Das Ergebnis dieser mühsamen Versuche läßt sich dahin zusammenfassen, daß es nicht gelungen ist mit aktiviertem Trypsin gegen unsere Stämme, die in hohem Maße für Bakteriophagen empfindlich sind, Phagen zu erzeugen.

Das aktivierte Trypsin, das tryptische Ferment des Pankreassaftes ist also das primum movens nicht. Auf Grund dieser Versuche lehnen wir Borchardts Theorie ab.

Wir haben noch eine andere Lösung gesucht, wie wir unter physiologischen Bedingungen sicher phagenfreien Darmsaft gewinnen könnten.

Wir versuchten am lebenden Tier phagenfreien Darmsaft zu gewinnen. Der einfache negative Nachweis, daß ein Darmsaft gegen unsere Stämme keine Phagen enthält, berechtigt, wie oben betont, uns nicht, den Darmsaft für phagenfrei zu erklären. Erst wenn wir

vorher vorhandene und nachgewiesene Phagen entfernt haben, haben wir die Berechtigung, anzunehmen, daß der Darmsaft phagenfrei ist. Wir trafen folgende Versuchsanordnung:

Bei einem Hund wurde ein ca. 30 cm langes oberes Dünndarmstück aus der Kontinuität des Darmes ausgeschaltet, das eine Ende blind zugenäht, das andere Ende mit der bekannten Schrägkanalmethode in die Haut eingenäht. Die Kontinuität des Darmes wurde mittels einer Seit- zu Seitanastomose wieder hergestellt, d. h. es wurde eine Thiryfistel angelegt. — Das ausgeschaltete Darmstück enthielt Phagen gegen Va 213 (++), M 10 (++) und M 37 (+). Das Darmstück wurde jeden Tag tüchtig durchgespült, die nach außen führende Oeffnung kräftig bougiert, um das Zuheilen des Ganges zu verhindern. Gespült wurde mit reinem Wasser, physiologischer Kochsalzlösung und zwischendurch mit verdünnter Säure, um antiphagisch zu wirken. Wir hatten auch zweimal in Abständen 1promill. Trypaflavinlösung eingespritzt, je 10 Minuten einwirken lassen, dann ablaufen lassen. Wir haben nicht nachgespült, so daß Trypaflavinreste noch nachträglich wirken konnten. Wir haben dann nach 3 Wochen aus dem Darmstück Darmsaft gewonnen mit der von Foà angegebenen Methode (in Abderhaldens Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden, Bd. III, 1, zit. von E. Zunz).

50 ccm einer verdünnten Salzsäurelösung (Foà empfiehlt 2proz. Lösung, wir haben ½proz. verwendet) spritzt man in das Darmstück ein und läßt sofort ablaufen; den auf diesen Reiz produzierten Saft fingen wir auf und untersuchten auf Phagen. Die Flüssigkeit erwies sich gegen unsere Stämme als phagisch unwirksam. Um nur eine Abschwächung der Phagen auszuschließen, haben wir Passagen gemacht. Unsere Ergebnisse zeigt folgendes Protokoll:

Röhrchen beimpft mit	1. Passage				2. Passage				3. Passage			
	Filtrate geprüft gegen											
	Va 213	M 10	M 37	K 11	Va 213	M 37	M 10	K 11	Va 213	M 10	M 37	K 11
Va 213	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M 10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
M 37	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Der aus dem ausgeschalteten Darmstück gewonnene Saft erwies sich also als phagenfrei gegen unsere Stämme, und, nach unserer Annahme, auch im absoluten Sinne des Wortes. Die Prüfung einige Tage darauf ergab dasselbe Resultat. Wir konnten daher

annehmen, daß in dem ausgeschalteten Darmstück ein phagenfreier Darmsaft sezerniert wird und konnten diesen Saft für unsere Untersuchungen verwenden. Wir haben ihn zur Aktivierung eines Pankreasextraktes verwendet, den wir aus dem steril entnommenen Organ eines Schweines, bald nach dem Tode des Tieres, gewonnen haben. Wir haben Pankreasextrakt verwendet, da uns seinerzeit kein Pankreassekret zur Verfügung stand; wir hielten es auch nicht für unbedingt notwendig, das Sekret zu aktivieren, da es bei diesem Versuch mehr auf den Darmsaft ankam. Die Untersuchung auf eine Entstehung des lytischen Prinzips erfolgte genau so, wie sie bei den Versuchen mit Enterokinase und Pankreasextrakt beschrieben ist. Wir fügen unser Protokoll bei:

Röhrchen No.	Zugesetzt	1. Passage				2. Passage				3. Passage			
		Filtrate geprüft gegen											
		Va 213	M 10	M 37	K 11	Va 213	M 10	M 37	K 11	Va 213	M 10	M 37	K 11
1	Darmsaft	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	Pa.-Extrakt + Darmsaft	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	Pankreasextrakt	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß der Darmsaft allein — enthaltend Erepsin und Enterokinase — der vom lebenden Tier in ein phagenfreies Milieu abgesondert wird, den lytischen Prozeß nicht hervorruft. Und auch der mit diesem Saft komplettierte Pankreasextrakt ist unwirksam.

II. Gewinnung des lytischen Prinzips aus den Bakterien allein.

A. Durch bakteriellen Antagonismus.

Die Konstanz der Arten der im Darm parasitierenden Bakterien trotz ständiger reichlicher Zufuhr von verschiedensten Bakterien mit der Nahrung, die Schwierigkeit, dem Darm unter physiologischen Bedingungen neue Parasiten anzuzüchten, dann das Vorhandensein von, gegen verschiedene pathogene Keime wirksamen Phagen im Darm, gegen welche sich die Bakterien der Darmflora meist als insensibel erweisen, ließ an neue Zusammenhänge denken. Sollten nicht die darmansässigen Bakterien, zum größten Teil Colibazillen, im Existenzkampfe gegen die neu eingeführten Bakterien gewisse Stoffe absondern, welche letztere auflösen, oder

die Stoffwechselprodukte der ersten letztere schädigen und so, vielleicht durch Aktivierung eines normalen Autolysins, das lytische Prinzip und die Auflösung der neu eingedrungenen Bakterien hervorrufen.

Diese Gedanken von einem bakteriellen Antagonismus führten zu den Floraversuchen, welche, wenig zahlreich, z. B. von Keller und E. Klieneberger (letztere im hiesigen Institut) ausgeführt wurden. — Diese Versuche endeten mit negativem Ergebnis; es gelang nicht mit dieser Methode das lytische Prinzip hervorzurufen.

Lisbonne und Carrère waren die ersten, die dem bakteriellen Antagonismus in der Erzeugung des lytischen Prinzips eine Rolle zuschrieben, auf Grund folgender Versuchsergebnisse. Sie beimpften z. B. eine Shigabouillonkultur mit einer Oese Colibazillen, bebrüteten die Kultur verschieden lange Zeit bei 37°, filtrierten sie dann durch die Kerze. 20 Tropfen des Filtrates wurden zu 10 ccm einer reichlich mit Shigabazillen beimpften Bouillon zugesetzt, bebrütet, dann filtriert usw. Nach 3—4 solcher Passagen erhielten sie typische gegen Shigabazillen gerichtete Phagen.

Beckerich und Hauduroy, später Bordet, untersuchten die ihnen von Lisbonne und Carrère übersandten, bei ihren Antagonismusversuchen verwendeten Colistämme. Letzterer fand auch den aus Wasser gezüchteten Colistamm lysogen, der früher von Lisbonne und Carrère und von Beckerich und Hauduroy untersucht, keine Zeichen der Lysogenität aufwies.

Es erwiesen sich alle Colistämme, die Lisbonne und Carrère bei ihren Versuchen verwendeten, als lysogene. Ihre Ergebnisse sind also für die Annahme einer entscheidenden Rolle des bakteriellen Antagonismus in der Entstehung des lytischen Prinzips nicht zu verwerten. Es bleibt weiter die Frage offen, ob nicht dem experimentell sicher festgestellten Antagonismus zwischen verschiedenen Bakterienstämmen in der Bakteriophagie eine gewisse Rolle zukommt. Weiterhin auch die Frage nach dem Zusammenhang zwischen der Konstanz der Darmflora, Phagengehalt des Darmes und rasche Ausscheidung der neu zugeführten Bakterien.

Um von dem bakteriellen Antagonismus und dessen Rolle bei der Phagenerzeugung eine Vorstellung zu gewinnen, machten wir folgende Versuche.

Die erste Voraussetzung war natürlich, daß man bei diesen Versuchen nicht lysogene Stämme verwenden soll. Unsere Stämme (Va 213, M 10, M 37, K 11) sind innerhalb der, bei diesen Versuchen üblichen Passage, d. i. Filtrationszahl sicher nicht lysogen. Wir verwendeten auch einen aus Schweinedarm isolierten Staphylokokkus, der uns infolge seiner konstant auftretenden merkwürdigen

Kolonienformen auffiel. Sie hatten gezackte, wie ausgefranste Ränder, die verwaschen sich allmählich an der Plattenoberfläche verlieren.

In unserer Methodik hielten wir uns an die Angaben von Lisbonne und Carrère, mit dem Unterschied, daß wir uns nicht nur auf Coli-Shiga-Mischkulturen beschränkten, sondern unsere Stämme kreuzweise aufeinander einwirken ließen.

Z. B. beimpften wir 40 ccm Bouillon reichlich mit Shigabazillen, ließen sie 5 Tage im Brutschrank, beimpften dann je 10 ccm davon „antagonistisch" mit je einer Oese Va 213, M 10 bzw. D 83 (der aus dem Schweinedarm gezüchtete Staphylokokkus). Als Kontrolle beimpften wir die Röhrchen homolog, d. h. mit M 37.

Nach neuerlichem Brutschrankaufenthalt (3 Tage) werden die Röhrchen filtriert; die Filtrate wurden mit Bouillon gemischt (1 : 3), neu beimpft mit dem Ausgangsstamm (hier M 37) bzw. je 0,5 ccm der Filtrate mit der Fürthplatte gegen unsere Stämme auf Phagenwirkung geprüft. Nach 2—3 Tagen im Brutschrank werden die Kulturen wieder filtriert, neu beimpft bzw. auf Phagenwirkung geprüft, wie vorher beschrieben. Wir führten diese Kulturen bis zur 5. Passage. Nach der 3. wurde wieder auch antagonistisch beimpft.

Alle diese Versuche waren negativ. Es gelang uns nicht, mit Hilfe des sogenannten bakteriellen Antagonismus das lytische Prinzip auszulösen.

In einem weiteren Versuch verwendeten wir den Nissleschen Stamm, den Coli mutaflor, der sich durch starke antagonistische Wirkung gegen den Typhusbazillus auszeichnet. Auch mit diesem Stamm gelang es uns nicht das lytische Prinzip auszulösen.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse schließen wir uns der Meinung der vorhergenannten Autoren an, daß dem bakteriellen Antagonismus in der Auslösung des lytischen Prinzips in vitro keine Rolle zukommt.

In unseren Erörterungen haben wir öfter den Ausdruck „lysogener" Stamm gebraucht, und verstanden darunter einen lege artis reingezüchteten Stamm, der gelegentlich spontan Phagen abgibt. Wir sind auf die Deutung dieser Erscheinung bisher nicht eingegangen; wir wollen jetzt diese Frage besprechen. Da die Frage der Lysogenität mit der Resistenz und Phagenempfindlichkeit eng zusammenhängt, wollen wir auch letztere kurz besprechen.

Ein Bakterienstamm A kann einem beliebigen lytischen Prinzip X gegenüber sensibel oder insensibel sein; im ersten Fall zeigt er mit dem Lysat zusammengebracht phagische Erschei-

nungen, im letzten nicht. (Wir wollen hier nur Grenzfälle besprechen und auf graduelle Unterschiede, z. B. der Sensibilität nicht eingehen.) Lassen wir nun auf die getrübte junge Bouillonkultur eines sensiblen Stammes den korrespondierenden Phagen einwirken, so sehen wir oft, daß nach erfolgter vollständiger Klärung die Kultur sich allmählich trübt. Diese nach erfolgter Klärung auftretende Trübung wird durch die Vermehrung jener Keime verursacht, welche dem lytischen Prinzip Widerstand leisteten und die als resistente Keime bezeichnet werden. Züchtet man den resistenten Stamm heraus und bringt ihn z. B. in Bouillon wieder mit dem Lysat zusammen, so wächst er, je nach dem Grade der Resistenz, im lysathaltigen Medium ungestört weiter. Man spricht von einer Resistenz, die der Stamm dem Lysat gegenüber erreichte (d'Herelle).

Ein solcher resistenter Stamm erweist sich meist als nicht homogen, d. h. vom bakteriophagischen Standpunkt aus betrachtet, liefert er verschiedene Kolonien.

Kuttner unterschied, mit Typhusbazillen arbeitend, zwei Arten von Kolonien, phagenfreie und mit Phagen infizierte. Bordet und Ciuca unterschieden drei Arten von Kolonien in den resistenten Stämmen: Phagenfreie resistente, phagenhaltige resistente und phagenfreie sensible. Es hängt von der Virulenz der Phagen und von der Resistenz der Bakterien ab, in welchem Verhältnis diese verschiedenen Bakteriensorten in den resistenten Stämmen enthalten sind. Eine solche Kultur bezeichnet d'Herelle als Mischkultur.

Das weitere Verhalten einer Mischkultur bei Ueberimpfungen hängt ab von der Virulenz der Phagen einerseits und dem Grade der Resistenz der Bakterien andererseits. Halten beide Komponenten einander die Wage (z. B. schwachvirulente Phagen und schwach resistente Bakterien, oder starke Virulenz der Phagen und starke Resistenz der Bakterien), so ist die Mischkultur unbegrenzt weiter züchtbar; sie bleibt eine Mischkultur, ohne phagische Zeichen zu zeigen. Gewinnt die eine der Komponenten die Ueberhand, so werden entweder die Phagen im Laufe der Ueberimpfungen ausgeschaltet und der reine Bakterienstamm bleibt übrig, oder die Bakterien werden von den Phagen aufgelöst und der Phage bleibt übrig, je nachdem das Gleichgewicht zu gunsten der Phagen oder der Bakterien verschoben wird. Wieder handelt es sich um Grenzfälle, zwischen welchen alle Uebergänge möglich sind.

Man kann das Gleichgewicht einer Mischkultur stören.

d'Herelle gibt an, daß es ihm gelungen sei, in manchen Fällen in Mischkulturen, welche in flüssigen Nährböden und auch auf festen (die Platten hatten eine 1—2 mm dicke Gelatineschicht) keine phagischen Merkmale aufwiesen, solche nachzuweisen, wenn er die Kultur auf 8—10 mm dicken Schichten ausstrich. Er nahm an, daß die Zwischenprodukte, welche bei der phagischen Wirkung entstehen, und die Phagie hemmen, bei einer dicken Gelatineschicht besser wegdiffundieren. Der Wegfall dieser Hemmungsstoffe begünstigt die Bakteriophagie. — Züchtet man die Mischkultur in zuckerhaltigen Medien, so verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der Bakterien, da die Phagen gegen die entstehende Säure empfindlicher sind als die Bakterien.

Eliava und Pozerski zeigten, daß man eine Mischkultur wieder reinzüchten kann, wenn man sie von Schrägagar auf Schrägagar 5—6mal überimpft, immer oben von der dünnsten Stelle des Agars, von der Mitte einer isolierten Kolonie abimpfend. Die so erhaltene Kultur ist phagenrein und resistent; sie gibt, wie auch behandelt, keine Phagen mehr ab, während aus der in Masse überimpften Mischkultur Phagen zu erhalten sind.

Aus den obigen Erörterungen wollen wir folgende Einzelheiten festhalten: es gibt Mischkulturen, Bakterien und Phagen enthaltend, welche, nach den üblichen Methoden der Bakteriologie weitergezüchtet, „Mischkulturen" bleiben, ohne sichere phagische Zeichen aufzuweisen. Dieses Gleichgewicht kann gestört werden; dann erhält man Phagen oder aber einen phagenfreien Stamm. Die besprochenen Versuche beziehen sich auf künstliche in vitro hergestellte Mischkulturen[1]).

B. Gewinnung von Phagen aus alten Kulturen, durch Autolyse usw.

Bail und Gildemeister teilten als erste mit, daß sie aus alten Bouillonkulturen von Laboratoriumsstämmen das lytische Prinzip erhalten hätten. Bald mehrten sich diese Befunde (Otto, Munter und Winkler, Weinberg und Aznar, Fejgin und Supniewski, A. Kuttner, K. W. Jötten, N. Ogata u. v. a.). Da diese Kulturen mit Stuhlfiltraten nicht in Berührung gebracht wurden, früher auch keine phagischen Zeichen gezeigt hatten, wurde angenommen, daß das lytische Prinzip aus den Bakterien stamme, es sei ein Autolysin, ein in den Bakterien normal vor-

1) Wir hielten uns in obigen Erörterungen meist an die Ausführungen d'Herelles; führten abweichende Anschauungen (z. B. ob die Resistenz durch natürliche Selektion [Gratia] oder durch Anpassung der Bakterien entsteht [d'Herelle] und ä. m.) nicht an, weil sie für unsere weiteren Besprechungen belanglos sind.

kommendes Ferment, das beim Altern der Kultur und Zerfall der Bakterien in Freiheit gesetzt würde. Doerr ist auf diese Theorie, nach welcher das lytische Prinzip ein normales Autolysin sei, genauer eingegangen und hat theoretisch und experimentell die Unhaltbarkeit dieser Annahme zu beweisen versucht.

Man bezeichnet solche Stämme, welche spontan phagische Zeichen aufweisen, als lysogene Stämme. Wie sind nun diese Befunde zu deuten?

Die Gegner der Lebewesentheorie hielten diese Befunde, das plötzliche Auftreten von Phagen in reingezüchteten Laboratoriumsstämmen, ohne daß man sie mit einem lytischen Prinzip in Berührung gebracht hätte, für schlagende Beweise. Das spontane Auftreten sei ein Beweis dafür, daß das lytische Prinzip von den Bakterien selbst stamme.

d'Herelle hält diese lysogenen Stämme für natürliche Mischkulturen und führt für seine Annahme folgende Argumente an. Es lassen sich mit den angegebenen Methoden der Phagenerzeugung (z. B. aus alten Bouillonkulturen) nur bei denjenigen Bakterienarten Phagen gewinnen, welche aus dem Darmtrakt gewonnen, reichlich Gelegenheit hatten, sich mit Phagen zu infizieren. Da im Darm oft korrespondierende Phagen vorhanden sind, sind die herausgezüchteten Bakterienstämme oft Mischkulturen von Bakterien und Bakteriophagen. Die einzelnen isolierten Kolonien derselben Bakterienart sind aus bakteriophagischem Standpunkt nicht immer gleich. Die eine Kolonie kann z. B. phagenfreie resistente, die andere phagenhaltige resistente, die dritte vielleicht sensible Bakterien enthalten. In welchem Verhältnis diese einzelnen Sorten in der Kultur vertreten sind, ist verschieden. Erwischt man bei der Reinzüchtung z. B. eine phagenfreie resistente oder sensible Kolonie, so sind die Nachkommen derselben, der Laboratoriumsstamm phagenfrei. Das erklärt, warum verhältnismäßig so wenig Laborstämme phagenhaltig und, unter bestimmten Bedingungen, lysogen sind.

Für die Annahme, daß die lysogenen Stämme natürliche Mischkulturen sind, spricht, daß sie sich wie die künstlichen Mischkulturen verhalten. Sie sind phagenfrei zu züchten (z. B. nach der Methode von Eliava und Pozerski) und mit diesen reingezüchteten Stämmen läßt sich dann kein lytisches Prinzip gewinnen.

Diese Meinung d'Herelles nahmen die Anhänger (Flu, Beckerich und Hauduroy, Prausnitz u. a.) und auch manche Gegner der Virustheorie an (Doerr, Suzuki). Suzuki, aus dem Bailschen Institut, lieferte experimentelle Beweise für die Richtigkeit dieser Meinung; er untersuchte das Verhalten künstlicher Mischkulturen und fand, daß sie mit den von Bail an einem sogenannten spontan lysogenen Stamm ermittelten Ergebnissen vollkommen übereinstimmen.

Um zur Klärung der Frage, ob es sich bei der Gewinnung von Phagen aus alten Kulturen um eine „Phagenentstehung" (Bail, Otto und Munter, Gildemeister und Herzberg u. v. a.) oder nur um die Gewinnung von Bakteriophagen aus natürlichen „Mischkulturen" (d'Herelle, Flu, Beckerich und Hauduroy, Prausnitz u. v. a.) handelt, beizutragen, versuchten wir nach der von Otto und Mitarbeitern angegebenen Methode aus unseren Stämmen Phagen zu gewinnen. Die verwendeten Stämme waren: M10, NO24, M37 und K11. In der Technik befolgten wir Otto und Munters Angaben.

10—15 Tage alte wiederholt beimpfte Bouillonkulturen wurden filtriert, die Filtrate auf Platten (je 0,5 ccm Filtrat in jeder Fürthplatte) geprüft gegen die 4 Stämme bzw. mit Bouillon im Verhältnis von 1 : 4 versetzt und neu mit je einer Oese einer frischen Bouillonkultur beimpft. Nach 2—3 Tagen Brutschrankaufenthalt wurden die Kulturen wieder filtriert und das Filtrat wie oben beschrieben, behandelt, d. h. Passagen gemacht. Wir führten die Kulturen, wenn früher keine Phagen auftraten, bis zur 25. Passage. Unsere Ergebnisse zeigt folgende Tabelle:

Bezeichnung des Stammes	Ergebnis
NO 24	nach 16 Passagen abgebrochen. Keine Phagen
M 10	„ 24 „ Phagen
M 37	„ 14 „ „
K 11	„ 25 „ abgebrochen. Keine Phagen

In 2 von 4 Fällen traten Phagen auf, die homolog wie heterolog wirksam waren.

Mit dem Stamm M37 haben wir den Versuch wiederholt, mit dem Unterschied, daß keine alte Bouillonkultur verwendet wurde und die Filtrate, statt mit einer Oese, mit 5 Tropfen frischer Bouillonkultur beimpft. Nach 10 Filtrationen erhielten wir homolog und heterolog wirksame Phagen.

Wir hatten auch versucht, nach vorangegangener chemischer Schädigung aus Kulturen durch fortgesetzte Filtration Phagen zu gewinnen. — Auf Agarplatten wurde je eine Oese einer 4 Stunden

alten Bouillonkultur von NO 24 bzw. M 37 ausgestrichen, auf die Mitte der Platten je ein Tropfen einer verdünnten Sublimatlösung gebracht (1 : 3000). Diese Stellen blieben steril, am Rand der sterilen Flecke fand ein durch Reizwirkung hervorgerufenes stärkeres Wachstum statt. Von dieser Reizzone wurde in Bouillon abgeimpft, nach 24 Stunden filtriert, das Filtrat homolog und heterolog geprüft bzw. Passagen gemacht. Ergebnis:

Sammlungsname	Ergebnis
NO 24	nach 9 Passagen Phagen
M 37	„ 13 „ „

Der Versuch mit M 37 wurde wiederholt, nach 10 Passagen traten Phagen auf.

Folgende Uebersichtstabelle gibt unsere Resultate, sowie die Wirkungsbreite der aufgetretenen Phagen gegen unsere Stämme wieder.

Versuche mit	Geschädigt mit	Phagen nach	Keine Phagen; abgebrochen nach	Wirkungsbreite und Stärke der Phagen: beim Auftreten NO 24	M 10	M 37	K 11	nach einer weiteren Filtration NO 24	M 10	M 37	K 11
NO 24	—	—	16 Pass.								
„	Sublimat	9 Pass.		+++		—		+++	++++	—	—
M 10	—	24 „			+			R.K. ++++	++++ R.K.	+	—
M 37	—	14 „		+++		+		+++	++++	+	—
„	Sublimat	13 „		+++	++++	+	—	+++	++++	+	—
„ Wiederholung	—	10 „		++	++++	++	—				
M 37	Sublimat	10 „		++	++++	++	—				
K 11	—	—	25 Pass.								

Bevor wir auf diese Ergebnisse sowie auf die Deutung derselben eingehen, wollen wir einiges über unseren Colistamm NO 24 mitteilen, dessen Verhalten in vieler Hinsicht interessant ist und manches in dem rätselhaften Verhalten der sogenannten lysogenen Stämme zu erklären scheint.

Der Stamm wird in unserem Institut schon seit Jahren weitergezüchtet und infolge seiner großen Phagenempfindlichkeit als Teststamm verwendet. Während der ganzen Zeit zeigte er nie spontane phagische Zeichen. Von den typischen Colistämmen wich er insofern ab, als er in Bouillon ständig mit Bodensatz wuchs, während die überstehende Flüssigkeit ganz klar blieb. Auch die Kolonieformen waren oft abweichend, sie zeigten auf einen Tag alten Platten unregelmäßige Formen mit etwas verwaschenen Rändern. Wegen dieser Eigenschaften war er uns verdächtig, wir versuchten aber vergebens, nach den Angaben von Preisz phagische Zeichen nachzuweisen. Während unserer obigen Versuche (nach Otto und Mitarbeitern) fiel uns ein merkwürdiges Verhalten an diesem Stamm auf, das verallgemeinert nach unserer Meinung eine Deutung des Wirkungsmechanismus der durch fortgesetzte Filtration gewonnenen Filtrate zuläßt.

Gelegentlich unserer obigen Versuche prüften wir Passagefiltrate (Anzahl der Filtrationen verschieden) von M10, M37 (nach Sublimatschädigung), NO24 (nach Sublimatschädigung) und K11 gegen NO24 und sahen auf all diesen Platten phagische Merkmale, während dieselben Filtrate homolog, d. h. M10-Filtrat gegen M10, K11-Filtrat gegen K11 usw. nicht wirksam waren. Das alles wies uns natürlich auf die Bouillonkultur NO24, aus der die Platten beimpft wurden. Die 2 Tage alte Bouillonkultur auf Agar ausgestrichen (1 Tropfen) ergab nach 18 Stunden 80—90 Einzelkolonien mit zum Teil sehr merkwürdigen Formen. Neben „gesunden", normalen Kolonieformen fanden sich einige Flatterformen, dann zahlreiche mit ausgefressener Mitte, so daß nur ein Wall übrig blieb. Aus diesen Kolonien ließen sich Phagen gewinnen, die leicht steigerungsfähig waren. Die Reinkultur des Stammes NO24 in Bouillon (NO24a) wurde also plötzlich phagisch. Um die Möglichkeit der Verunreinigung dieser Bouillonkultur mit von außen stammenden Phagen auszuschließen, wurde auf das Schrägagarröhrchen, von welchem die Bouillon beimpft wurde, zurückgegriffen. Neuerliche Abimpfung in Bouillon (NO24b). Je eine Oese der 24 Stunden alten Kultur wurde mit den obigen Kulturfiltraten, bzw. für sich als Kontrolle ausgestrichen. Die Kulturfiltrate waren homolog und heterolog geprüft unwirksam, nur die Platten, an denen sie gegen NO24b geprüft wurden, wiesen zum Teil konfluierende

Löcher auf, während die Kontrollplatte NO24b für sich einen normalen Rasen zeigte.

Wir behielten die Bouillonkultur NO24b weiter im Auge. Eine Oese der 3 Tage alten Bouillonkultur auf Agar ausgestrichen, ergab nach 18 Stunden zahlreiche Einzelkolonien mit unregelmäßiger Begrenzung, darunter viele Flatterformen.

Wie sind nun diese Befunde zu deuten? Waren die Phagen schon in der jungen Bouillonkultur vorhanden, oder sind sie erst in der 3 Tage alten Kultur entstanden? Haben die Kulturfiltrate neue Phagen erzeugt, oder haben sie nur latente, präexistente Phagen manifest gemacht?

Die Filtrate waren an und für sich phagisch indifferent, das zeigen die homolog und heterolog beimpften Platten. Die 1 Tag alte Kultur hatte aber schon die Neigung — zunächst neutral ausgedrückt — Phagen abzugeben, da die 3 Tage alte Bouillonkultur ohne Filtratzusatz spontan Phagen abgab. Die Kulturfiltrate wirkten also nicht erzeugend, sondern nur beschleunigend auf einen auch an sich vor sich gehenden Prozeß.

Offen steht noch die Frage: sind die Phagen neu entstanden, oder waren sie schon in der 1 Tag alten Kultur vorhanden und nur, weil fester an die Bakterien gebunden, nicht manifest? Wir glauben, daß die Phagen schon in der 1tägigen Kultur vorhanden waren, daß sie aber, infolge des Gleichgewichtes zwischen Phagenvirulenz und Resistenz der Bakterien nicht manifest wurden. Erst als das Gleichgewicht zugunsten der Bakteriophagen verschoben wurde — durch die Einwirkung der Kulturfiltrate oder durch Altwerden der Bouillon (beide wirken im selben Sinne, durch angesammelte Stoffwechselprodukte schädigend) — wurden die Phagen manifest.

Für diese Annahme spricht auch das weitere Verhalten der Bouillonkultur NO24b. Ein Tropfen der 4 Tage alten Kultur auf Platte ausgestrichen, ergab einen normalen Rasen. Nach dieser Auffassung waren in der 3 Tage alten Bouillonkultur Phagen und sensible Bakterien nebeneinander vorhanden. Nun geschah das, was wir vom experimentellen Zusammenbringen von Phagen und sensiblen Bakterien kennen: die sensiblen werden aufgelöst, nur einzelne resistente bleiben übrig, die sich dann weiter vermehren. In der

4 Tage alten Bouillonkultur hat sich „über Nacht" das alte Gleichgewicht zwischen Bakteriophagen und Bakterien hergestellt. Es gelang uns nicht mehr, in der Kultur Phagen nachzuweisen. — Der herausgezüchtete Stamm erwies sich, mit den hochgetriebenen Spontanphagen zusammengebracht, als resistent.

Wir haben öfters von diesem Agarröhrchen in Bouillon abgeimpft und erhielten manchmal gar keine, manchmal in der einen Tag alten Kultur Phagen, manchmal erst aus 2—3 Tage alten Kulturen, die vorher und später dann keine Phagen aufwiesen. Wir griffen nun auf den in der Sammlung aufgehobenen Stamm zurück, der durch zeitweise Ueberimpfungen weitergeführt wird, und erhielten auch aus ihm Phagen in 2—4 Tage alten Bouillonkulturen.

Dieses Verhalten des Stammes NO24, nämlich daß er nur zu bestimmten, allerdings verschiedenen Zeitpunkten Phagen abgibt, weder vorher noch nachher, erklärt, warum bisher seine Lysogenität übersehen worden ist. Besonders, da bei der üblichen Phagentechnik meist 4—18 Stunden alte Bouillonkulturen verwendet werden. Wenn wir uns vorstellen, daß dieser Zeitraum der manifesten Lysogenität manchmal nur ein paar Stunden dauert, so ist es uns erklärlich, warum man mit verschiedenen Methoden, oder auch mit derselben Methode zu verschiedenen Zeiten bei demselben Stamm verschiedene Resultate erhält. So erhielten wir z. B. gegen NO24 Phagen nach vorangegangener chemischer Schädigung und Filtration, während mit Filtration allein kein Phage zu erzielen war. Wir können uns nach dem obigen leicht vorstellen, daß wir sowohl das positive wie das negative Ergebnis einem Zufall zu verdanken hatten, es kommt eben auf den richtigen Zeitpunkt an. Diesen Zeitpunkt mit Sicherheit zu ermitteln, ist uns bisher nicht gelungen. Wir haben diesen Fall mitgeteilt, um zu zeigen, welche Zufälligkeiten, welche komplizierten Verhältnisse daran Schuld sein können, daß ein lysogener Stamm, besser gesagt, die Lysogenität eines Stammes nicht erkannt wird.

Bei dem Stamm NO24 ist noch eine interessante Einzelheit zu erwähnen. Der Stamm wächst regelmäßig mit dickem Bodensatz und vollständig klarer überstehender Flüssigkeit. Bei diesem morphologischen Verhalten ist der Stamm äußerst lysosensibel. Haben wir den Stamm mit Phagen in Bouillon zusammengebracht und die resistenten Keime herausgezüchtet, so wuchsen diese resistenten in flüssigen Nährböden mit gleichmäßiger Trübung

ohne Bodensatz. Diese Varietät hält sich noch nach 35 Reinzüchtungen mittels isolierter Kolonien, es ändert sich weder die Wachstumsform noch die Resistenz. Es gelingt uns jederzeit diese „Variation" hervorzurufen. Im sonstigen bakteriologischen Verhalten stimmen beide überein. Variationen, durch bakteriophagische Einwirkung entstanden, sind hinlänglich bekannt. Im allgemeinen wird angenommen, daß das Wachstum mit Bodensatz für resistente Stämme charakteristisch sei (Gratia), während unser Stamm das umgekehrte Verhalten zeigt.

Kehren wir nun nach dieser Abschweifung zu unserem Thema zurück. Wie aus der Uebersichtstabelle ersichtlich, ist es uns gelungen, bei Stämmen, die vorher keine bakteriophagischen Zeichen aufwiesen, durch serienweise Filtration, mit oder ohne chemische Schädigung Phagen zu gewinnen. (Die Ergebnisse mit Stamm NO24 können wir infolge seiner manifesten Lysogenität nicht verwenden).

Wie sind diese Befunde zu deuten? Können wir sie als Erzeugung, Neuschaffung von lytischem Prinzip ansprechen, oder wurden nur präexistente, latente Phagen manifest?

Es kommt bei diesen Versuchen zur Anhäufung von Stoffwechselprodukten. Die Ansammlung von Stoffwechselprodukten allein ist aber das lytische Prinzip nicht. Denn in diesem Falle müßten immer bei demselben Stamm, der schon einmal Phagen abgab, nach einer bestimmten Anzahl von „Passagen" Phagen auftreten. Das ist aber nicht der Fall.

Wir erhielten vom Stamm M10 nach 24, von M37 nach 10 Filtrationen Phagen. Wir griffen nun auf die 20. bzw. 6. Passage zurück und versuchten, von da ausgehend, mittels neuer Filtrationspassagen nochmals Phagen zu gewinnen. Das gelang uns auch nach 12 Passagen (im ganzen also 32 bzw. 18 Passagen) noch nicht. (Versuch abgebrochen).

Zusammenfassend können wir heute über die von Otto und Mitarbeitern angegebene Methode der „Phagenerzeugung" folgendes aussagen: Es lassen sich mit dieser Methode aus manchen Laboratoriumsstämmen Phagen gewinnen. Man gewinnt sie aber nur aus den Stämmen der Coli-Typhus-Dysenteriegruppe, allgemein, aus Stämmen, die aus dem Darm bzw. tierischen Körper stammen, die dort reichlich die Gelegenheit hatten mit Phagen in Berührung zu kommen. Diese Phagen abgebenden „lysogenen" Stämme

verhalten sich aber ganz gleich den künstlich im Reagenzglas hergestellten Mischkulturen zwischen Bakterien und Bakteriophagen, sie sind beide „reinzüchtbar", nach welcher Reinzüchtung sie keine Phagen mehr abgeben. Auf Grund dieser Erwägungen schließe ich mich der Meinung d'Herelles an, daß diese lysogenen Stämme als in der Natur vorkommende Mischkulturen aufzufassen sind. Deshalb können, nach meiner Meinung, die Versuchsergebnisse mit der Methode Otto und Mitarbeitern nicht als einwandfreie Beweise einer künstlichen Erzeugung gelten, sie lassen eher eine andere Deutung zu, die Annahme, daß damit nur präexistente latente Phagen manifest werden. Für diese Annahme sprechen unsere Versuche mit dem Stamm NO24 (s. o.).

Es gelang uns nicht, — die Versuchsergebnisse zusammenfassend —, mit Hilfe von leukozytären Exsudaten, von aktiviertem Trypsin oder sonstigen Pankreasfermenten und Darmsaft, auch nicht mit Hilfe des bakteriellen Antagonismus in vitro Phagen zu erzeugen. Die Versuchsergebnisse mit der Methode Otto und Mitarbeiter können wir nicht als für eine Erzeugung beweisend ansprechen. Wir haben also bisher keine einwandfreie Methode einer Phagenerzeugung; wohl können aber gelegentlich mit diesen Methoden latente Phagen manifest werden. Der „direkte" Beweis, der unbedingt schlagend wäre gegen die d'Herellesche Theorie, nach welcher die Bakteriophagen ein filtrierbares lebendes Virus sind, fehlt; die berichteten Ergebnisse der Phagenerzeugung müssen anders gedeutet werden und können nicht mehr als Beweise für Phagenerzeugung dienen.

Zusammenfassung.

1) Die von Bordet und Ciuca stammende Angabe einer Phagenerzeugung mit Hilfe leukozytärer Exsudate in vivo konnte in einigen eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Die positiven Ergebnisse der beiden Autoren müssen mit der Verwendung lysogener Stämme erklärt werden, nachdem Lisbonne und Carrère den verwendeten Stamm später als lysogen erkannt haben.

2) Die Entstehung von Bakteriophagen mit Hilfe leukozytärer Exsudate in vitro (Lisbonne, Boulet und Carrère, Pico) konnte gleichfalls im eigenen Versuch nicht bestätigt werden.

3) Es wird auf die verschiedenen Fehlerquellen hingewiesen, die ein positives Ergebnis vortäuschen können: a) das primäre

Vorhandensein von auf die eingespritzten Bakterien wirksamen Bakteriophagen im Darmtrakt des Tieres (d'Herelle); b) die „übliche" Methode der Prüfung der Fäzes auf Bakteriophagen berechtigt nicht, die Phagenfreiheit des Untersuchungsobjektes gegen den Teststamm anzunehmen, es wird vielmehr, auch auf Grund eigener Versuche die Fortführung der Untersuchung bis zur 3. Passage für notwendig erachtet.

4) Die Frage, ob die Bakteriophagen aus dem intakten Darm auf einen Reiz in die Peritonealhöhle oder in die Blutzirkulation übertreten, ist noch nicht entschieden. Die wenigen, von mir in dieser Richtung ausgeführten Versuche sprechen nicht dafür.

5) Die bisher berichteten Phagenbefunde mit Pankreasextrakten sind wohl der Verunreinigung mit phagenhaltigem Material zuzuschreiben. Unter sterilen Kautelen gewonnene Organe, wie Leber, Niere, Bauchspeicheldrüse oder Thymus, enthalten keine Phagen (E. Klieneberger).

6) Borchardts Versuch vom Auftreten von Phagen im Darmtrakt des Versuchstieres gegenüber stomachal eingeführten Bakterien läßt auch eine andere begründete Deutung zu: es könnte sich um Adaptation schon vorhandener Phagen handeln, und nicht um eine Entstehung, wie Borchardt annimmt.

7) Borchardts Versuche mit Pankreas- und Duodenalextrakten sind keine genügende Grundlage für seine Folgerungen und Theorie; weil a) von mehreren Versuchen nur einer positiv ausgefallen ist; b) seine Erklärung für die negativen Ergebnisse nicht stichhaltig ist; c) die Prüfung des Duodenalextraktes auf evtl. schon vorhandene Phagen ungenügend war.

8) Tierversuche wurden ausgeführt, um mit Phagen sicher nicht verunreinigte normale Enterokinase, Trypsinogen und Darmsaft in vivo zu gewinnen.

9) Es ist gelungen eine phagenhaltige Enterokinaselösung mit Hilfe neutraler Chininsalze phagenfrei zu machen, ohne daß sie die aktivierende Wirkung auf Trypsinogen eingebüßt hätte. Damit ist die Möglichkeit einer Trennung beider Prinzipien gegeben.

10) Es ist gelungen, ein ausgeschaltetes Darmstück des Hundes durch verschiedene Eingriffe phagenfrei zu machen, und so sicher phagenfreien Darmsaft in vivo zu erhalten.

11) Die gewonnenen Verdauungssäfte wurden auf ihre phagenerzeugende Fähigkeit geprüft und es wurde gezeigt, daß weder dem

Darmsaft allein, noch dem mit Enterokinase aktivierten Trypsinogen die Fähigkeit der Erzeugung des lytischen Prinzips in vitro zukam. Somit ist ein sicherer experimenteller Beweis gegen die Allgemeingültigkeit der Borchardtschen Theorie geliefert.

12) Die von Lisbonne und Carrère behauptete Entstehung des lytischen Prinzips durch bakteriellen Antagonismus wurde nicht bestätigt. Die berichteten positiven Ergebnisse werden durch Verwendung nachgewiesener lysogener Stämme bei den Versuchen erklärlich.

13) Es wurden die Versuche besprochen, die zum Ziel hatten, autolytische Fermente der Bakterien in Freiheit zu setzen; diese „gesteigerten" Autolysine sollen (nach Gildemeister, Otto und Munter, Pico u. v. a.) die Bakteriophagen sein. Auch diese Versuche führten nicht zum Ziel.

14) In der Frage der lysogenen Stämme schloß ich mich im allgemeinen der d'Herelleschen Meinung an: sie wurden deshalb für in der Natur vorkommende Mischkulturen angesehen. Experimentelle Nachprüfungen sprechen für diese Annahme. Die Entstehung von Phagen in alten Kulturen wird deshalb einer solchen früheren Infektion mit Bakteriophagen zugeschrieben.

15) Es wird über Variationserscheinungen eines lysogenen Colistammes berichtet, es bestehen regelmäßige Zusammenhänge zwischen Wachstumsform und Sensibilität bzw. Resistenz.

16) Es wird zugegeben, auf Grund eigener Versuche, daß man mit der von Otto und Munter angegebenen Methode bei einer Anzahl von Stämmen der Typhus-Coligruppe Phagen gewinnen kann. Die Deutung der Versuche von den oben genannten Autoren wird aber abgelehnt. Auf Grund theoretischer Ueberlegung und experimenteller Ergebnisse über das Verhalten eines lysogenen Stammes (NO 24) schließe ich mich der Meinung d'Herelles u. a. an, daß es sich hier um ein Manifestwerden schon vorhandener Phagen handelt, infolge einer Störung des Gleichgewichtes zwischen Bakterien und Bakteriophagen.

17) Es besteht also bisher keine einwandfreie Methode der Erzeugung von Bakteriophagen und diese „direkten" Beweise gegen die Virustheorie d'Herelles sind hinfällig. Mit den bisher angegebenen Methoden kann man nicht Phagen „erzeugen", wohl aber gelegentlich latente Phagen manifest werden lassen, und zwar

vielleicht schneller als es ohne Anwendung dieser Methoden geschehen würde.

Literatur.

1) Bachmann et Aquino, Compt. rend. Soc. Biol., T. 86, p. 1108.
2) Beckerich et Hauduroy, Compt. rend. Soc. Biol., T. 86, p. 881.
3) Borchardt, W., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 37, H. 1/2.
4) — Klin. Wochenschr., Bd. 2, S. 295.
5) — ebenda, Bd. 2, S. 791.
6) Bordet, J. et Ciuca, M., Compt. rend. Soc. Biol., T. 83, p. 1293.
7) — — ebenda, T. 83, p. 1296.
8) — — ebenda, T. 84, p. 276.
9) — — ebenda, T. 84, p. 747.
10) Bordet, J., Compt. rend. Soc. Biol., T. 88, p. 1211.
11) — ebenda, T. 90, p. 96.
12) — ebenda, T. 93, p. 1054.
13) — Ann. Inst. Pasteur, Bd. 39, S. 717.
14) Botez, A., Compt. rend. Soc. Biol., T. 85, p. 585.
15) Bruynoghe, R. et Maisin, J., Compt. rend. Soc. Biol., T. 84, p. 847.
16) Bürgers und Bachmann, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 101, S. 350.
17) Caublot, P., Compt. rend. Soc. Biol., T. 93, p. 1583.
18) Combiesco, D., ebenda, T. 87, p. 17.
19) Cohnheim, O., Abdershaldens Handb. d. biochem. Arb.-Meth., Bd. 6, S. 564.
20) Dimtza, A., Schweiz. med. Wochenschr., Bd. 56, S. 1185.
21) Doerr, R., Klin. Wochenschr., Bd. 2, S. 909.
22) — Schweiz. med. Wochenschr., 1923, S. 1011.
23) Dumas, J., Compt. rend. Soc. Biol., T. 83, p. 1314.
24) Eliava, G. et Pozerski, E., Compt. rend. Soc. Biol., T. 84, p. 708.
25) — — ebenda, T. 85, p. 139.
26) Fabry, P., Compt. rend. Soc. Biol., T. 87, p. 363.
27) — et J. v. Beneden, Compt. rend. Soc. Biol., T. 90, p. 109.
28) Fejgin, Br. et Supniewski, J., Compt. rend. Soc. Biol., T. 89, p. 1385.
29) Flu, P. C., Compt. rend. Soc. Biol., T. 89, p. 970.
30) — Centralbl. f. Bakt. usw., Abt. II, Bd. 59, S. 317.
31) — ebenda, Abt. I, Orig., Bd. 97, S. 1.
32) Gildemeister, E. und Herzberg, K., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 93, S. 402.
33) Gohs, W., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 49, S. 532.
34) Gratia, A., Compt. rend. Soc. Biol., T. 84, p. 751.
35) — ebenda, T. 86, p. 276.
36) — et Jaumain, ebenda, T. 85, p. 880.
37) Hajós, K., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., S. 583.
38) Hauduroy, P., Compt. rend. Soc. Biol., T. 92, p. 1442.
39) d'Herelle, Compt. rend. Ac. Sciences, T. 165, p. 373.
40) — Compt. rend. Soc. Biol., T. 86, p. 477.
41) — ebenda, T. 86, p. 663.

42) d'Herelle, Compt. rend. Soc. Biol., T. 87, p. 665.
43) — ebenda, T. 93, p. 509.
44) — Le Bactériophage et son comportement, Masson et Cie., 1926, 2 Edit.
45) Hoder und Suzuki, Centralbl. f. Bakt. usw., Abt. I, Orig., Bd. 98, S. 433.
46) Jaumain, D., Compt. rend. Soc. Biol., T. 87, p. 790.
47) Jötten, K. W., Klin. Wochenschr., Bd, 1, S. 2181.
48) Kabéshima, T., Compt. rend. Soc. Biol., T. 83, p. 219.
49) — ebenda, T. 83, p. 471.
50) Keller, W., Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 103, S. 177.
51) [1]) Klieneberger, E., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 56.
52) Kuttner, A. G., Proc. Soc. f. Exp. Biol. u. Med., Vol. XVIII, p. 222.
53) — Journ. of Bact., Vol. 8, p. 49.
54) Lisbonne, Boulet et Carrère, Compt. rend. Soc. Biol., T. 86, p. 340.
55) — et Carrère, L., ebenda, T. 86, p. 569.
56) — — ebenda, T. 87, p. 1011.
57) — — ebenda, T. 88, p. 724.
58) — — ebenda, T. 90, p. 265.
59) Magnus-Alsleben, E., Handb. d. norm. u. path. Physiol., Bd. 3.
60) Maisin, Compt. rend. Soc. Biol., T. 84, p. 468.
61) Marcuse, K., Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt., Bd. 102, S. 206.
62) Mc Kinley, E. B., Journ. of Bact., Vol. 8, p. 543.
63) Ogata, N., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 93, S. 329.
63a) Osumi, S., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 40, 1924, S. 261.
64) Otto und Munter, Deutsche med. Wochenschr., 1921, S. 1577.
65) — und Winkler, ebenda, 1922, S. 383.
66) —, Munter und Winkler, Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., Bd. 96, S. 118.
67) — — Jahresberichte Weichardt, 1924.
68) Pico, C. E., Compt. rend. Soc. Biol., T. 86, p. 1106.
69) — — ebenda, T. 87, p. 687.
70) — — ebenda, T. 87, p. 826.
71) — ebenda, T. 87, p. 836.
72) — ebenda, T. 89, p. 753.
73) — T. 91, p. 31.
74) Pierret, R. et Bilouet, V., ebenda, T. 93, p. 635.
75) — — ebenda, T. 95, p. 301.
76) Prausnitz, C., Handb. d. exper. Ther. Wolff-Eisner.
77) — und Firle, E., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 93, S. 148.
78) —und van der Reis, V., Deutsche med. Wochenschr., 1925, S. 304.
79) v. Preisz, H., Die Bakteriophagen. Jena, G. Fischer, 1925.
80) Putter, E., und Vallen, S., Klin. Wochenschr., Bd. 2, S. 339.
81) Schuurmann, C. J., Der Bakteriophage, eine Ultramikrobe. 1925, übersetzt von G. Fenner, 1927.

1) Da auch M. Neisser, Vortrag: „Unsichtbare Feinde der Bakterien (Bakteriophagen)"; Natur und Museum, H. 3 u. 4, 1927; und ein Vortrag von R. Kopp, früherem Assistenzarzt des Instituts, Klin. Wochenschr., 6. Jahrg., No. 23, 1927.

82) Seiffert, W., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 38, S. 292.
83) Starling, E. H., Abderhaldens Handb. d. biochem. Arb.-M., Bd. 7, S. 65.
84) Sumiyoshi, Y., Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig., Bd. 39, S. 377.
85) Suzuki, K., Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 47, S. 143.
86) Umber, F., Handb. d. inn. Med., herausg. v. Bergmann u. Staehelin, Bd. 3, S. 204.
87) Waldschmidt-Leitz, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 132, S. 181.
88) Weinberg et Aznar, Compt. rend. Soc. Biol., T. 86, p. 833.
89) — — ebenda, T. 87, p. 136.
90) Zoeller et Manoussakis, ebenda, T. 93, p. 1091
91) Zunz, E., Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbt. M., Bd. 3, S. 206.

Lebenslauf.

Geboren am 15. IV. 1904 zu Groß-Wardein in Siebenbürgen als Sohn des Kaufmannes Martin Leitner und seiner Ehefrau Helene geb. Blau. Nach Vollendung meiner Gymnasialstudien besuchte ich vom Frühjahr 1922 die Universität Wien (8 Semester), wo ich das Physikum bestand. Vom Frühjahr 1926 ab besuchte ich die Med. Fakultät der Universität Frankfurt a. M., und bestand im April 1927 das medizinische Staatsexamen. Seit Juni 1927 arbeite ich am Städt. Hygienischen Universitätsinstitut Frankfurt a. M., Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. M. Neisser.

gez. **Nikolaus Leitner.**

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.